

NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit

目录号: E041

产品描述:

第一链cDNA合成试剂盒是以mRNA或者总RNA为模板, 高效合成第一链cDNA。本试剂盒使用NovoScript® Reverse Transcriptase 反转录酶 (Cato: E123), 它的RNase H的活性与AMV反转录酶相比较低。该反转录酶可耐受42~50°C温度。试剂盒中含有重组RNA酶抑制剂 (Cat. No:E125), 可耐受55°C高温, 有效防止RNA降解; 同时含有Oligo(dT)₁₈, 用于以有poly(A)尾巴的mRNA为模板合成cDNA; 本试剂盒也可采用基因特异性引物。合成的第一链cDNA能直接用作PCR或荧光定量PCR的模板, 第二链cDNA的合成或线性RNA扩增, 也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验。

产品特点:

- NovoScript 反转录酶无 RNase H 活性, 可避免第一链 cDNA 合成过程中, RNA/DNA 杂交模板链中 RNA 降解, 保证 cDNA 合成的质量。
- 反转录反应可使用 Random N6 或 Oligo(dT)₁₈ 为引物, 也可同时使用 Random N6 和 Oligo(dT)₁₈ 做引物, 或使用基因特异性引物进行反转录。

保存温度: -20°C。

产品包装:

产品组成	A 包装	B 包装
NovoScript® Reverse Transcriptase (200U/μl)	50μl	100μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	50μl	100μl
5×NovoScript® RT Buffer	1ml	1ml×2
dNTPs (10mM each)	200μl	400μl
Oligo(dT) ₁₈ (100μM)	100μl	200μl
Random N6 (100μM)	100μl	200μl
GAPDH Forward primer (10μM)	20μl	40μl
GAPDH Reverse primer (10μM)	20μl	40μl
RNase Free Water	1ml	1ml×2

注意事项:

- 1) 用 DEPC 处理实验用到的所有实验器材, 或购买已经证明无核酸酶的实验用具, 实验过程戴手套并经常更换手套, 避免 RNA 酶的污染。
- 2) 确保所用试剂中无 RNA 酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中, 所有管子确保扣严。
- 4) 纯化过的 RNA 必须保证不含有盐, 金属离子, 乙醇和苯酚, 以上成分会干扰第一链 cDNA 合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除掉痕量污染物。
- 5) 为保证反转录反应有效进行, 需使用高质量的 RNA 模板。
- 6) 有实验结果提示, 本反转录酶可在 15 分钟内完成 1kb 反转录反应。

操作方法:

I. 第一链 cDNA 合成

试剂融化后，可将试剂盒中各组分稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物:

模板RNA	总 RNA(0.1 ng -5μg)
	poly(A) mRNA(10pg)
	特异性 RNA(0.01pg)
引物	Oligo (dT) ₁₈ 1μl
	Random N6 1μl
	基因特异性引物 15-20 pmol
5×NovoScript® RT Buffer	4μl
RNase Inhibitor	1μl
dNTPs (10mM each)	2μl
NovoScript® Reverse Transcriptase	1μl
RNase Free Water	至 20μl

可选步骤: 如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构, 可先将 RNA 模板和 RNase Free Water 混匀后, 65°C 孵育 5 分钟 (有助于打开高级结构, 便于下一步反应的进行), 迅速置于冰上冷却, 再加入其它组分。

2) 轻轻混匀, 离心。

3) 42°C 孵育 15-30 分钟 (如果 RNA 模板中不含 poly A 结构, 25°C 先孵育 5 分钟, 随后 42°C 孵育 15-30 分钟)。

4) 产物可直接用于下一步反应。如果不立即使用, 可于-20°C 保存一周, 长时间保存建议-70°C 放置。

II. 第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

常用反应体系 (50μl):

2×Taq Master Mix*	25μl
上游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
模板	1-2μl
ddH ₂ O	至 50μl
*Mg ²⁺ 终浓度为 2mM	

常用 PCR 循环:

94°C,	1 分钟 30 秒
30 次循环:	94°C, 20 秒
	57°C, 20 秒
	72°C, 1kb/60 秒
72°C	5 分钟
4°C	保温